



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C07H 21/00, C12N 15/11, A61K 31/70</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 96/34008</b> (43) Date de publication internationale: 31 octobre 1996 (31.10.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00652 (22) Date de dépôt international: 29 avril 1996 (29.04.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/05165                  28 avril 1995 (28.04.95)                  FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR). MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE [FR/FR]; 57, rue Cuvier, F-75005 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): HELENE, Claude [FR/FR]; 14, quai d'Orléans, F-75004 Paris (FR). HERDEWIJN, Piet [BE/BE]; Olivierstraat 21, B-3111 Wezemaal (BE). SAISON-BEHMOARAS, Ester [FR/FR]; 84, avenue de Choisy, F-75013 Paris (FR). VAN AER-SCHOT, Arthur [BE/BE]; Heist-Goostraat 29, B-2220 Heist-op-den-Berg (BE). NGUYEN, Thanh, Thuong [FR/FR]; 31, route de Tigy, F-45510 Vienne-en-Val (FR).	(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Aîné, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.          Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: NOVEL ANTISENSE NUCLEIC ACIDS DIRECTED AGAINST RAS ONCOGENES, THEIR PREPARATION AND USE (54) Titre: NOUVEAUX ANTISENS DIRIGES CONTRE RAS, PREPARATION ET UTILISATIONS (57) Abstract <p>The present invention concerns single-strand antisense nucleic acids complementing a region of an mRNA of a human RAS oncogene with localized mutation, comprising between 8 and 20 nucleotides and a group of the formula <math>-(CHR)_n-OH</math> in position 3' and/or 5', in which n is an integer between 1 and 20 inclusive and R is a hydrogen atom or an OH group.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne des acides nucléiques antisens simple-brin complémentaires d'une région d'un ARNm d'un oncogène ras humain portant une mutation ponctuelle, comprenant 8 à 20 nucléotides et un groupement de formule <math>-(CHR)_n-OH</math> en 3' et/ou en 5', dans laquelle n représente un nombre entier compris entre 1 et 20 inclus, et R représente un atome d'hydrogène ou un groupe OH.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

## NOUVEAUX ANTISENS DIRIGES CONTRE RAS.

### PREPARATION ET UTILISATIONS

La présente invention concerne des acides nucléiques antisens dirigés contre les ARN messagers des oncogènes ras, leur préparation et leur utilisation, notamment pour le traitement des maladies tumorales. Elle concerne également les compositions pharmaceutiques comprenant lesdits acides nucléiques antisens, éventuellement adsorbés, inclus ou encapsulés dans des nanoparticules. Elle concerne plus particulièrement des acides nucléiques antisens modifiés capables d'inhiber spécifiquement l'expression des oncogènes ras mutés.

Différents gènes, appelés oncogènes et gènes suppresseurs, sont impliqués dans le contrôle de la division cellulaire. Parmi ceux-ci, les gènes ras, et leurs produits généralement désignés protéines p21, jouent un rôle clé dans le contrôle de la prolifération cellulaire chez tous les organismes eucaryotes où ils ont été recherchés. Notamment, il a été montré que certaines modifications spécifiques de ces protéines leur font perdre leur fonction normale et les conduisent à devenir oncogéniques. Ainsi, un grand nombre de tumeurs humaines ont été associées à la présence de gènes ras modifiés, et en particulier de gènes ras possédant des mutations ponctuelles, le plus souvent sur les positions 12, 13 et 61. De même, une surexpression des protéines p21 peut conduire à un dérèglement de la prolifération cellulaire. La compréhension du rôle exact de ces protéines p21 dans les cellules, et la mise au point de méthodes permettant d'inhiber leur activité dans les cellules tumorales constituent donc un enjeu majeur pour l'approche thérapeutique du cancer.

Une des approches proposées dans l'art antérieur pour inhiber l'activité des oncogènes ras réside dans l'utilisation d'oligonucléotides antisens. La régulation de l'expression de gène-cibles au moyen d'oligonucléotides antisens constitue en effet une approche thérapeutique en développement croissant. Cette approche repose sur la capacité des oligonucléotides à s'hybrider spécifiquement à des régions complémentaires d'un acide nucléique, et à inhiber ainsi spécifiquement l'expression de gènes déterminés. Cette inhibition peut intervenir soit au niveau traductionnel (oligonucléotide anti-sens) soit au niveau transcriptionnel (oligonucléotide anti-gène). Plus particulièrement, les acides nucléiques anti-sens sont des séquences nucléiques

capables de s'hybrider sélectivement avec des ARNs messenger cellulaires-cible, pour inhiber leur traduction en protéine. Ces oligonucléotides forment avec l'ARNm-cible, de manière locale, des régions double-brin, par interaction de type Watson-Crick classique. Il peut s'agir par exemple d'oligonucléotides synthétiques, de petite taille, complémentaires d'ARNm cellulaires, et qui sont introduits dans les cellules-cible. De tels oligonucléotides ont par exemple été décrits dans le brevet n° EP 92 574. Il peut également s'agir de gènes anti-sens dont l'expression dans la cellule-cible génère des ARN complémentaires d'ARNm cellulaires. De tels gènes ont par exemple été décrits dans le brevet n° EP 140 308.

10           Cependant l'utilisation in vivo d'acides nucléiques antisens dirigés contre les gènes ras se heurte à un certain nombre de difficultés qui limitent jusqu'à aujourd'hui leur exploitation thérapeutique. Tout d'abord, les acides nucléiques présentent une grande sensibilité à la dégradation par des enzymes de l'organisme, telles que les nucléases, ce qui implique l'emploi de doses importantes. De plus, ils ont une faible  
15           pénétration dans certains types cellulaires et une distribution intracellulaire souvent inadéquate, ce qui les rend sans effet thérapeutique. Enfin, il est important de pouvoir disposer de séquences suffisamment sélectives et stables pour obtenir un effet spécifique sans altérer d'autres fonctions cellulaires.

          Pour tenter de résoudre certains de ces problèmes, il a été proposé de  
20           modifier chimiquement le squelette phosphodiester des acides nucléiques, pour donner lieu à de nouvelles classes d'oligonucléotides artificiels. Parmi ceux-ci, on peut citer les oligonucléotides phosphonates, phosphotriesters, phosphoramidates et phosphorothioates qui sont décrits, par exemple, dans la demande de brevet WO94/08003, les oligonucléotides couplés à différents agents tels que du cholestérol,  
25           un peptide, un polymère cationique, etc. Toutefois, si certains de ces composés modifiés présentent une bonne résistance aux nucléases, leur pouvoir de pénétration et de distribution dans les différents compartiments cellulaires reste très faible. De plus leur activité biologique n'est généralement pas augmentée et ils présentent certains effets secondaires liés à la présence de motifs non-naturels dans leur structure.

30           La présente invention offre une solution particulièrement avantageuse à ces problèmes. La présente invention fournit en effet de nouveaux acides nucléiques

antisens dirigés contre ras, présentant une modification chimique particulière. De manière particulièrement avantageuse, les antisens selon l'invention présentent non seulement une résistance élevée aux nucléases, mais également une bonne pénétration cellulaire suivie d'une répartition appropriée dans les cellules, une très haute sélectivité vis-à-vis de leur cible, et forment des complexes particulièrement stables avec leur cibles.

Un premier objet de la présente invention réside dans un acide nucléique antisens simple-brin complémentaire d'une région d'un ARNm d'un oncogène ras humain portant une mutation ponctuelle, caractérisé en ce qu'il comprend 8 à 20 nucléotides et un groupement de formule  $-(CHR)_n-OH$  en 3' et/ou en 5', dans laquelle n représente un nombre entier compris entre 1 et 20 inclus, et R représente un atome d'hydrogène ou un groupe OH, R pouvant varier d'un groupement (CHR) à un autre.

De manière surprenante, la demanderesse a maintenant montré qu'il était possible d'obtenir in vitro des effets antiprolifératifs sélectifs en utilisant des acides nucléiques antisens courts modifiés chimiquement par adjonction d'un groupement  $-(CHR)_n-OH$  en 3' et/ou en 5'. Les résultats présentés dans les exemples montrent en outre que les antisens ainsi obtenus possèdent une résistance accrue vis-à-vis des nucléases et une activité biologique supérieure. En outre ils n'induisent aucune cytotoxicité apparente et sont dépourvus d'effets secondaires importants. Les résultats obtenus confirment que ces propriétés sont tout à fait inattendues dans la mesure où les antisens de l'invention sont actifs à des concentrations jusqu'à 500 fois inférieures à celles nécessaires pour d'autres types d'antisens (cholestérol, polymère, etc) y compris les oligophosphodiester naturels.

Comme indiqué ci-avant, le groupement de formule  $-(CHR)_n-OH$  peut être couplé en 3', en 5' ou en 3' et en 5' de l'acide nucléique antisens. D'une manière générale, l'antisens et le groupe  $-(CHR)_n-OH$  sont synthétisés séparément, puis assemblés par réaction chimique classique. Une méthode pour le couplage du groupement  $-(CHR)_n-OH$  dans chacune de ces positions est donnée dans les exemples.

Préférentiellement, dans la formule  $-(CHR)_n-OH$ , n est un nombre entier compris entre 3 et 12 inclus. Des résultats particulièrement intéressants ont été

obtenus avec des antisens modifiés par un groupement dodécanediol (n=12), propanediol (n=3), diméthyl-1,3-propanediol (n=5), ou glycérol (n=3).

Les acides nucléiques utilisés dans le cadre de la présente invention ont une longueur comprise avantageusement entre 8 et 20 nucléotides. La demanderesse a en effet montré qu'il était plus avantageux pour obtenir un effet sélectif combiné à une bonne stabilité, d'utiliser des oligonucléotides relativement courts. Comme illustré dans les exemples, la sélectivité de l'acide nucléique antisens anti-ras est particulièrement importante lorsque l'oligonucléotide possède une longueur inférieure, à 14 bases. Il est donc particulièrement avantageux d'utiliser des acides nucléiques de taille comprise entre 8 et 13 bases. Encore plus préférentiellement, les acides nucléiques utilisés dans le cadre de la présente invention ont une longueur comprise entre 10 et 13 nucléotides. Des résultats particulièrement avantageux ont été obtenus avec des acides nucléiques de 12 nucléotides. A titre d'exemple, on peut citer les acides nucléiques antisens de séquence SEQ ID n° 1 (AS2); SEQ ID n° 10 (AS4); SEQ ID n° 14 ou SEQ ID n° 15 qui possèdent des propriétés tout à fait remarquables. Les antisens modifiés suivants sont tout particulièrement préférés au sens de la présente invention : AS2-3'm12OH; 5'm12OH-AS2; AS2-3'm3OH; 5'm3OH-AS2; 5'm12OH-AS2-3'm12OH, AS4-3'm12OH; 5'm12OH-AS4; AS4-3'm3OH; 5'm3OH-AS4 et 5'm12OH-AS4-3'm12OH, AS2-3'Glycérol ; AS4-3' Glycérol.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré de l'invention, les acides nucléiques utilisés sont choisis de sorte que la mutation ponctuelle ciblée sur l'oncogène ras soit localisée au centre de la région complémentaire. La demanderesse a en effet montré qu'il était particulièrement avantageux que l'acide nucléique antisens utilisé soit centré autour de la mutation ciblée. Comme illustré dans les exemples, lorsque l'acide nucléique est centré sur la mutation, une inhibition sélective de 100% est obtenue, alors que celle-ci n'est que de 50% lorsque la mutation est décalée seulement de 2 bases. Ces résultats particulièrement surprenants permettent, pour une région cible donnée, de préparer des acides nucléiques antisens beaucoup plus efficaces.

Par ailleurs, pour améliorer encore l'efficacité thérapeutique des antisens de l'invention, d'autres modifications chimiques peuvent être combinées à la présence du

groupe  $(\text{CHR})_n\text{-OH}$ . En particulier, la combinaison avec un agent intercalant, tel l'acridine, permet d'augmenter encore les potentialités des antisens (Cf exemples). L'agent intercalant peut être introduit au sein de l'antisens ou à l'une des extrémités, ou aux deux. Des résultats particulièrement avantageux ont été obtenus avec un antisens modifié par un groupement acridine en 5' et en 3' (Acr-ASm12OH). La synthèse de cet oligonucléotide a été réalisée par couplage dans un premier temps du groupement dodécanediol en 3' selon les techniques illustrées dans les exemples, puis du groupement acridine en 5' selon les techniques décrites par Hélène dans les demandes EP 117777 et EP 169787 par exemple, ou selon tout autre protocole connu de l'homme du métier. Il est également possible de coupler d'abord le groupement acridine puis ensuite le groupement dodécanediol.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les acides nucléiques antisens peuvent être adsorbés, inclus ou encapsulés dans des nanoparticules. Les nanoparticules utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être toute particule de petite dimension, généralement inférieure à 500 nm, constituée de polymère(s) biocompatible(s), capable de transporter ou de vectoriser un principe actif dans les cellules ou dans la circulation sanguine. Préférentiellement, les nanoparticules selon l'invention sont constituées par des polymères comportant une majorité de motifs dégradables tels que l'acide polylactique, éventuellement copolymérisé à du polyéthylène glycol, ou les cyanoacrylates d'alkyle. D'autres polymères utilisables dans la réalisation de nanoparticules ont été décrits dans l'art antérieur (voir par exemple EP 275 796 et EP 520 889). A titre d'exemple, on peut utiliser des nanoparticules constituées de polymères de cyanoacrylates d'alkyle (telles que décrits dans le brevet européen EP 0 007 895 et le brevet français 8 08172) ou de polymères de l'acide lactique ou de copolymères de l'acide lactique et de l'acide glycolique (telles que décrites par G. Spenlehauer et coll., J. Control. Release, (1988), 7, 217-229; EP 520888; EP 520 889).

Les nanoparticules selon l'invention possèdent généralement un diamètre moyen de l'ordre de 50 à 500 nanomètres. De préférence, les nanoparticules utilisées dans le cadre de la présente invention ont un diamètre moyen de l'ordre de 150 nanomètres.

D'un intérêt tout particulier sont les nanoparticules obtenues par polymérisation des cyanoacrylates de méthyle, d'éthyle, d'isobutyle ou d'isohexyle ou celles obtenues par copolymérisation de l'acide lactique et de l'acide glycolique.

Par ailleurs, préalablement à leur encapsulation, les acides nucléiques de l'invention sont généralement associés à des composés hydrophobes cationiques. L'emploi de tels composés permet en effet de faciliter l'association des acides nucléiques avec les nanoparticules. Plus particulièrement, les composés hydrophobes cationiques utilisés dans les compositions selon l'invention permettent de former des paires d'ions entre les dérivés phosphorés chargés négativement de la chaîne nucléique et les cations hydrophobes et d'augmenter ainsi le caractère lipophile et l'adsorption des acides nucléiques aux nanoparticules. D'une manière générale, les composés hydrophobes cationiques utilisables dans la préparation des compositions selon l'invention sont choisis parmi les halogénures de tétraphénylphosphonium, de préférence le chlorure; les sels d'ammonium quaternaires, choisis plus particulièrement parmi les halogénures de triméthylalkylammonium tels que les chlorures ou les bromures de dodécyltriméthylammonium, de tétradécyltriméthylammonium, d'héxadécyltriméthylammonium ou de cétyltriméthylammonium; les amines grasses, telles que la D,L-dihydrosphingosine (D,L-dihydroxy-1,3 amino-2 octadécane), ou les oligopeptides, tels que la polylysine et les oligopeptides de formule (LKKL)<sub>n</sub>, (LKLK)<sub>n</sub> ou (LRRL)<sub>n</sub>. De manière particulièrement avantageuse, on utilise dans le cadre de l'invention d'un sel d'héxadécyltriméthylammonium ou un oligopeptide.

Les compositions nanoparticulaires selon l'invention peuvent être obtenues par toute méthode permettant d'adsorber, d'inclure ou d'encapsuler un acide nucléique, associé ou non à un composé hydrophobe cationique, dans une nanoparticule.

Généralement, les compositions nanoparticulaires selon l'invention peuvent être obtenues :

- par mise en présence de l'acide nucléique et éventuellement du composé hydrophobe cationique avec les nanoparticules dans des conditions qui permettent une rétention (ou une absorption) forte de l'acide nucléique sur les nanoparticules et une atteinte facile des cellules cibles,



- soit par mise en présence de l'acide nucléique et éventuellement du composé hydrophobe cationique avec les unités monomères, suivie d'une polymérisation,
- soit par mise en présence de l'acide nucléique et éventuellement du composé hydrophobe cationique avec le polymère au cours de la polymérisation c'est-à-dire après le démarrage de la polymérisation mais avant l'achèvement de celle-ci.

De préférence, les compositions selon l'invention sont obtenues par adsorption, inclusion ou encapsulation sur les nanoparticules déjà formées.

Les nanoparticules de polycyanoacrylates d'alkyle peuvent être préparées dans les conditions décrites dans le brevet européen EP 0 007 895 et le brevet français 81 08172 et celles d'acide polylactique-polyglycolique dans les conditions décrites par G. Spenlehauer et coll., J. Control. Release, (1988), 2, 217-229.

L'adsorption des l'acide nucléique complexés ou non par les composés hydrophobes cationiques sur les nanoparticules est généralement effectuée en agitant une suspension de nanoparticules avec l'acide nucléique complexé par le composé hydrophobe cationique dans des conditions déterminées.

Les nanoparticules ainsi transformées sont généralement séparées par filtration ou centrifugation et sont utilisées pour préparer des compositions pharmaceutiques thérapeutiquement utiles.

Généralement, l'adsorption est effectuée en milieu aqueux dont le pH est tamponné à une valeur voisine de 7.

Comme tampon peut être utilisé le tampon TRIS-HCl.

Par ailleurs pour stabiliser la suspension, il peut être utile d'opérer en présence d'un agent stabilisant tel qu'un copolymère synthétique de polyoxyéthylène-polyoxypropylène non ionique comme le poloxamer 188 ou un polyoxyéthylène. Cet agent stabilisant permet en particulier de réduire les phénomènes d'adhésion entre particules conduisant à la formation d'agrégats.

L'adsorption est généralement effectuée à une température voisine de 20°C et la réaction est terminée après quelques heures d'agitation.

Il est particulièrement avantageux d'utiliser, au début de l'opération d'adsorption, une concentration en nanoparticules comprise entre 0,5 et 50 mg/cm<sup>3</sup> et de préférence voisine de 1 mg/cm<sup>3</sup>.

La concentration en acides nucléiques est généralement comprise entre 0,01 et 500  $\mu\text{M}$ . La concentration choisie en acide nucléique dépend essentiellement de la concentration en nanoparticules et de la concentration finale désirée.

Par ailleurs, pour augmenter l'adsorption des acides nucléiques sur les nanoparticules, il peut-être avantageux d'opérer en présence d'un excès de composé hydrophobe cationique.

D'une manière générale, l'efficacité d'adsorption des acides nucléiques aux nanoparticules dépend essentiellement de la longueur de la chaîne nucléotidique et de la densité des charges à la surface des particules.

Un autre objet de l'invention concerne les compositions pharmaceutiques comprenant un acide nucléique antisens tel que défini ci-dessus, en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants pharmaceutiquement acceptables. L'antisens peut être encapsulé ou non, étant entendu que même sous forme libre, il présente des propriétés antiprolifératives *in vivo* tout à fait remarquables. Les compositions selon l'invention peuvent être utilisées *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. *In vitro*, elles peuvent permettre de transférer à des lignées cellulaires des acides nucléiques antisens, par exemple dans le but d'étudier la régulation des protéines ras et la voie de signalisation ras-dépendante. *Ex vivo*, elles peuvent être utilisés pour le transfert thérapeutique d'acides nucléiques antisens anti-ras dans une cellule issue d'un organisme, en vue de conférer à ladite cellule une résistance aux oncogènes ras, avant sa réadministration à un organisme. *In vivo*, elles peuvent être utilisés pour l'administration directe d'acides nucléiques antisens anti-ras. En particulier, une administration intra-tumorale est tout à fait avantageuse puisqu'elle permet de délivrer efficacement et localement la composition active. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent donc un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection intratumorale. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Les compositions selon l'invention étant capables de moduler l'activité des protéines ras oncogènes, elles permettent d'inhiber le processus de développement et

peuvent ainsi être utilisées pour le traitement de différents cancers. De nombreux cancers ont en effet été associés à la présence de protéines ras oncogéniques. Parmi les cancers renfermant le plus souvent des gènes ras mutés, on peut citer notamment les adénocarcinomes du pancréas, dont 90% ont un oncogène Ki-ras muté sur le douzième codon (Almoguera et coll., Cell 53 (1988) 549), les adénocarcinomes du colon et les cancers de la thyroïde (50%), les cancers de la vessie (40%, voir Alcishi et al., Int. J. Onc. 4 (1994) 85) ou les carcinomes du poumon et les leucémies myéloïdes (30%, Bos, J.L. Cancer Res. 49 (1989) 4682).

La présente invention sera décrite plus en détail avec les exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

### Légende des figures

Figure 1 : Position sur leur cible (A) et efficacité d'hybridation (B) des antisens 1-5, mesurée par l'induction d'une coupure de l'ARN cible pour la RNase H. Position sur leur cible (C) et efficacité d'hybridation (D) des antisens R1-R8 mesurée comme en (B).

### Matériels et Méthodes

#### Synthèse des acides nucléiques antisens simple-brin

Les différents acides nucléiques utilisés ont été synthétisés en utilisant un synthétiseur automatique en phase solide (Applied Biosystems, Foster city, CA) selon la chimie des phosphoramidites. Les acides nucléiques ont ensuite été précipités deux fois à l'éthanol, lavés en présence de 75% d'éthanol, puis mis en solution dans l'eau.

#### Clivage par la RNase H

Les expériences de clivage par la RNase H à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa (HeLa Scribe, Nuclear extract, Promega) ont été réalisées dans le mélange réactionnel (25 µl) contenant 40 mM Tris pH 7,9; 100 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,8 µl d'extrait nucléaire de HeLa, 2µg d'ADN transporteur, 4 nM d'ARNm ras sauvage ou muté et 5 µM de chaque acide nucléique à tester. Les réactions ont été réalisées sans pré-mélangeage de l'ARNm et de l'acide nucléique à tester. Après

traitement au phénol et précipitations, les produits de clivage par la RNase H ont été analysés par électrophorèse sur gel de séquençage polycarylamide (6%). Les gels ont ensuite été autoradiographés, et la quantité de matériel intact et de produit de clivage a été déterminée par densitométrie.

5 Lignées cellulaires utilisées

- HBL100 : lignée cellulaire épithéliale humaine accessible à l'ATCC

- HBL100ras1 : Cette lignée dérive de la lignée mammaire humaine HBL100 par transformation avec un plasmide pSV2 portant l'oncogène Ha-Ras humain EJ/T24. Cette lignée exprime la forme sauvage de Ha-ras, ainsi que la forme portant la mutation ponctuelle G → U en position 12, codant pour l'acide aminé valine au lieu d'une glycine (Ha-ras VAL12 (Lebeau et al., Oncogene 6 (1991) 1125).

- HBL100néo : Cette lignée dérive également de la lignée mammaire humaine HBL100, par transformation avec un plasmide pSV2 témoin. Cette lignée exprime donc uniquement la forme sauvage de Ha-ras.

15 Préparation des nanoparticules

- Nanoparticules de polyisohexylcyanoacrylate : Une suspension nanoparticulaire a été préparée par addition, sous agitation magnétique, de 100 µl d'isobutylcyanoacrylate ou d'isohexylcyanoacrylate à un milieu de polymérisation composé d'acide chlorhydrique (1 mM, pH = 3 ou 10 mM, pH = 2) et de 1 g/100 cm<sup>3</sup> de dextran. La polymérisation des monomères cyanoacryliques s'effectue spontanément à une température voisine de 20°C. La polymérisation est totale après 2 heures en utilisant l'isobutylcyanoacrylate et après 6 heures en utilisant l'isohexylcyanoacrylate. Après neutralisation, 0,4 g/100 cm<sup>3</sup> de poloxamer 188 est ajouté pour stabiliser les nanoparticules.

- Nanoparticules d'acide lactique-acide glycolique : 10 mg/cm<sup>3</sup> d'un copolymère d'acide lactique-acide glycolique contenant 75 % d'unités lactiques D et L et 25 % d'unités glycoliques sont mis en suspension dans un milieu contenant 10 mM de TRIS-HCl à pH = 7 et 0,5 % de lécithine. Après 12 heures d'incubation, les nanoparticules peuvent être séparées de la suspension.

30 Encapsulation des acides nucléiques dans les nanoparticules

Les nanoparticules préparées ci-dessus à une concentration de 0,5 mg/cm<sup>3</sup> sont incubées avec 500 µM d'acide nucléique, 500 µM de cation hydrophobe (par exemple le CTAB), dans un tampon Tris-HCl (10 mM, pH = 7) sans chlorure de sodium (Chavany et al, Pharmaceutical Res. 9 (1992) 441). Après 6 à 8 heures  
5 d'incubation, les nanoparticules peuvent être séparées de la suspension ou bien la suspension peut être utilisée, après dilution, pour tester l'efficacité de l'acide nucléique adsorbé sur les cellules appropriées.

Généralement, quelques µl de la suspension diluée (environ 100 fois dans l'eau distillée) sont ajoutés à 100 µl du milieu de culture contenant les cellules, le  
10 nombre de µl ajoutés étant calculé pour obtenir la concentration souhaitée en acide nucléique.

### Exemples

#### 15 Exemple 1 : Sélection de l'antisens

##### 1.1. Effet de la longueur

Cet exemple montre que la longueur peut avoir un impact important à la fois sur la sélectivité et sur l'affinité de l'antisens et que, contrairement à la tendance générale, l'utilisation d'antisens de taille limitée offre des avantages très importants.

20 Les antisens suivants ont été synthétisés :

- 5'-CACACCGACGGC (SEQ ID n° 1) - 12 mer
- 5'-CACACCGACGGCG (SEQ ID n° 2) - 13 mer
- 5'-CACACCGACGGCGC (SEQ ID n° 3) - 14 mer
- 5'-CACACCGACGGCGCC (SEQ ID n° 4) - 15 mer
- 25 - 5'-CCACACCGACGGCGCC (SEQ ID n° 5) - 16 mer

La position de ces antisens vis-à-vis de la séquence cible (SEQ ID n° 6) est présentée sur la figure 1A. Les antisens correspondants dirigés contre le messenger de ras normal ont également été synthétisés.

30 Ces différents antisens ont été incubés en présence d'extraits nucléaires de cellules HeLa, et leur capacité à hybrider avec le messenger de ras muté a été

déterminée par clivage par la RNase H comme décrit dans les matériels et méthodes. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 1B. Ils montrent que les antisens AS-Val produisent déjà une réponse maximale. Ils montrent également qu'un signal non-sélectif important apparaît dès que la longueur de l'antisens dépasse 13 nucléotides. Ces résultats montrent donc que le meilleur rapport sélectivité/affinité est obtenu avec les antisens de 12 ou 13 mer.

### 1.2. Effet de la position

Cet exemple montre que, en plus de la longueur, la position de l'antisens par rapport à sa séquence cible est importante.

Les antisens 12-mer suivants ont été synthétisés :

- 5'-TGCCCACACCGA (R1 : SEQ ID n° 7)
- 5'-GCCCACACCGAC (R2 : SEQ ID n° 8)
- 5'-CCACACCGACGG (R3 : SEQ ID n° 9)
- 5'-CACACCGACGGC (R4 : SEQ ID n° 1)
- 5'-CACCGACGGCGC (R5 : SEQ ID n° 10)
- 5'-CCGACGGCGCCC (R6 : SEQ ID n° 11)
- 5'-GACGGCGCCCAC (R7 : SEQ ID n° 12)
- 5'-ACGGCGCCCACC (R8 : SEQ ID n° 13)

20.

La position de ces antisens vis-à-vis de la séquence cible (SEQ ID n° 6) est présentée sur la figure 1C. Ces différents antisens ont été incubés en présence d'extraits nucléaires de cellules HeLa, et leur capacité à hybrider avec le messager de ras muté a été déterminée par clivage par la RNase H comme décrit dans les matériels et méthodes. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 1D. Ils montrent que les antisens centrés autour de la région mutée de la séquence cible (R4 et R5) ont la meilleure sélectivité vis-à-vis de l'ARN de l'oncogène muté, bien qu'ils n'aient pas l'efficacité la plus grande.

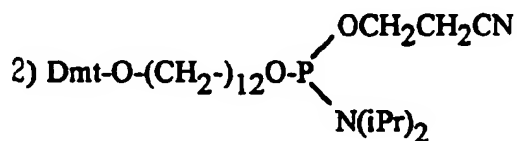
Exemple 2 : Préparation de 5'-HO(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CACACCGACGGC (5'-m<sub>12</sub>OH-AS2).

30

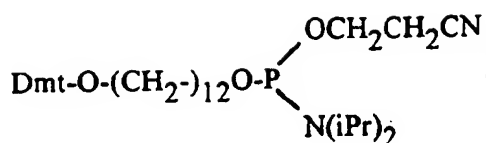
2.1) 1-Diméthoxytrityl-1,12-dodécanediol (Dmt-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>OH)

A une solution de 1,12-dodécanediol (15 mmoles) et de N-éthyl-diméthylamine (6 mmoles) dans 20 cm<sup>3</sup> de pyridine anhydre, on ajoute à une température voisine de 20°C et sous agitation du chlorure de diméthoxytrityle (3 mmoles) puis continue l'agitation pendant 2 heures à une température voisine de 20°C. Au mélange réactionnel on ajoute 30 cm<sup>3</sup> d'une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 5 % puis on extrait le produit avec du dichlorométhane. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium. Après filtration et concentration à sec sous pression réduite, le produit obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane-méthanol (97-3 en volumes). On obtient ainsi, avec un rendement de 75 %, le Dmt-O(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>OH dont les caractéristiques sont les suivantes :

R<sub>f</sub> = 0,65 (Kieselgel 60F 254 Merck ; dichlorométhane-méthanol (9-1 en volumes))



Le composé Dmt-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>OH obtenu précédemment (1,2 mmole) est séché par co-évaporation sous pression réduite avec de la pyridine anhydre puis il est maintenu sous pression réduite pendant une nuit. On solubilise le produit dans une solution de diméthyléthylamine (0,44 g) dans du dichlorométhane (8 cm<sup>3</sup>) puis on ajoute lentement, sous atmosphère d'argon et sous agitation, du 2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylamino-chloro-phosphite (0,7 g, 3 mmoles). Après 30 minutes de réaction, on ajoute au mélange réactionnel 50 cm<sup>3</sup> d'acétate d'éthyle, puis on lave la solution organique avec une solution aqueuse à 10 % d'hydrogénocarbonate de sodium (2 fois 80 cm<sup>3</sup>) et enfin avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (20 cm<sup>3</sup>). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium. Après filtration et concentration à sec sous pression réduite, le produit est chromatographié sur une colonne de gel de silice en éluant avec un mélange d'acétate d'éthyle et de triéthylamine. On obtient ainsi avec un rendement de 80 % le



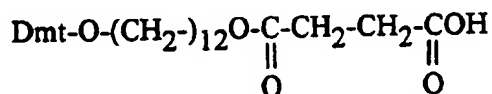
dont les caractéristiques sont les suivantes :

Rf = 0,73 et 0,8 (stéréoisomères) (Kieselgel 60F 254 Merck ; acétate d'éthyle-triéthylamine (9-1 en volumes).

2.3) On réalise l'assemblage du dodécadésoxynucléotide selon la méthode au  
 5 phosphoramidite sur un synthétiseur d'ADN en utilisant le désoxycytidine CPG (10  
 µmoles) et 50 µmoles de désoxyribonucléoside-3'-(2-cyanoéthyl)-,  
 diisopropylaminophosphoramidite par cycle. Après détritylation le support est traité  
 pendant 10 minutes sous atmosphère d'argon avec une solution du phosphoramidite  
 préparé selon l'exemple 2.2 (1 cm<sup>3</sup> 0,1M dans l'acétonitrile) et de tétrazole (3 cm<sup>3</sup>  
 10 0,5M dans l'acétonitrile). Après élimination de la phase liquide, le support est ensuite  
 traité avec 10 cm<sup>3</sup> d'une solution d'iode [0,01M d'iode dans le mélange acétonitrile-  
 eau - collidine (65-30 en volumes)]. On isole le support puis on le traite avec une  
 solution d'ammoniaque concentré pendant 7 heures à 55°C. Après avoir éliminé le  
 support par filtration, la solution est évaporée à sec sous pression réduite puis le  
 15 résidu est traité, pendant 30 minutes à une température voisine de 20°C, avec de  
 l'acide acétique. On élimine l'acide acétique par évaporation sous pression réduite. Le  
 produit obtenu est purifié par FPLC. Le temps de rétention du produit purifié est  
 donné dans le tableau I.

Exemple 3 - Préparation de 5'CACACCGACGGC-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>OH (AS2-3'-m<sub>12</sub>OH)

20 3-1) 1-Diméthoxytrityl-12-succinyl-1,12-dodécanediol

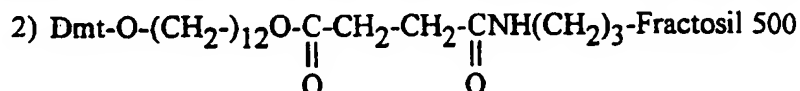


On fait réagir, à une température voisine de 20°C, sous agitation, pendant  
 18 heures, une solution du produit préparé selon l'exemple 2.1 (2 mmoles), de  
 diméthylaminopyridine (1,1 mmole) et d'anhydride succinique (1,6 mmole) dans la  
 25 pyridine anhydre (4 cm<sup>3</sup>). On élimine la pyridine sous pression réduite. Le résidu  
 obtenu est repris avec 15 cm<sup>3</sup> de dichlorométhane puis la solution organique est lavée  
 avec une solution aqueuse d'acide citrique à 10 % (2 fois 10 cm<sup>3</sup>) puis avec de l'eau.



La phase organique est séchée et évaporée. Le résidu qui est séché sous pression réduite présente les caractéristiques suivantes :

R<sub>f</sub> = 0,5 [Kieselgel 60F 254 Merck ; dichlorométhane-méthanol (9-1 en volumes)].



5 A une solution de produit préparé selon l'exemple 3.1 (0,5 mmole) dans un mélange p.dioxane/pyridine (95-5 en volumes ; 2,1 cm<sup>3</sup>) on ajoute sous agitation à une température voisine de 20°C, une solution de dicyclohexylcarbodiimide (1,25 mmole) dans 300 µlitre de p.dioxane. On continue l'agitation pendant une heure à une température voisine de 20°C, on élimine la dicyclohexylurée par filtration. La solution  
10 obtenue est traitée par 1,5 g d'aminopropyl-Fractosil 500 en suspension dans la diméthylformamide et 0,38 cm<sup>3</sup> de triéthylamine pendant 18 heures à une température voisine de 20°C. Le support est isolé par filtration puis lavé avec de l'acétonitrile et séché sous pression réduite. La capacité du support obtenu est déterminée par dosage spectrophotométrique de la quantité de cations diméthoxytrityles libérée par un  
15 traitement acide d'un échantillon du support sec. En général le support possède une capacité de 70 µmoles/g. Afin d'acétyler les fonctions amines résiduelles, le support est repris dans 6 cm<sup>3</sup> de pyridine et traité par 0,6 cm<sup>3</sup> d'anhydride acétique en présence de 30 mg de 4-diméthylaminopyridine. Après une heure de réaction, le support est isolé par filtration, lavé au dichlorométhane, au méthanol et à l'éther puis  
20 séché sous pression réduite.

3-3) En utilisant le support préparé selon l'exemple 3.2 (10 µmoles), l'assemblage de la séquence du dodécamère est réalisé automatiquement sur synthétiseur selon la méthode au phosphoramidite par l'intermédiaire de désoxyribonucléoside-3'-(2-cyanoéthyl)-diisopropylaminophosphoramidite (50 µmoles par cycle). La  
25 déprotection et la purification du dodécamère sont réalisées selon les conditions décrites dans l'exemple 2.3. Le temps de rétention du produit purifié est donné dans le tableau I.

#### Exemple 4 - Préparation de 5'(CCACACCGA)3'p(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>OH

En opérant comme dans l'exemple 3 on a obtenu le nonanucléotide (SEQ ID  
30 n° 14) dont le temps de rétention est donné par le tableau I.

Exemple 5 : Préparation de  $\text{HO}(\text{CH}_2)_{12}\text{p d}^5'(\text{CACACCGACGGC})^3'\text{p}-(\text{CH}_2)_{12}\text{OH}$  (5'm12OH-AS2-3'm12OF).

En opérant comme dans l'exemple 2 et en remplaçant le désoxycytidine CPG par le support préparé selon l'exemple 3 on prépare le dodécamère substitué en 3' et en 5' par le groupe  $(\text{CH}_2)_{12}\text{OH}$ . Le tableau I donne le temps de rétention du produit purifié.

TABLEAU I.

Exemple	Temps de rétention (minutes) *
2	20,4
3	20,1
4	19,2
5	23,2

\* FPLC : colonne Mono P HR 5/5 (Pharmacia) ;  
solvant A : 0,01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dans le mélange acétonitrile-eau (2-8 en volumes ; pH = 6,8) et solvant B : 0,01M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1M NaCl dans le mélange acétonitrile-eau (2-8 en volumes ; pH = 6,8) ; gradient linéaire de 0 à 100 % en B ; débit : 1 cm<sup>3</sup>/minute.

Exemple 6 : Préparation de  $\text{d}^5'(\text{CACCGACGGCGC})\text{p}(\text{CH}_2)_3\text{OH}$

6.1) Diméthoxytrityl-1,3-propanediol

0,725 ml (10 mmoles) de 1,3-propanediol ont été dissous dans 20 ml de pyridine anhydre, et 4,07 g (12 mmol) de chlorure de diméthoxytrityl ont été ajoutés. Le mélange est agité 2h à température ambiante, après quoi, le TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 99:1) témoigne que la réaction est pratiquement complète. La réaction est alors stoppée par addition d'un excès de MeOH puis, après 10 min, le mélange est concentré. Le concentrat est partitionné entre la phase  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et une solution aqueuse à 5%  $\text{NaHCO}_3$  (2x), puis la phase organique est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . La purification sur gel

de silice conduit à 1,7g (4,47 mmol) du produit attendu.  $R_f = 0,44$  (Alugram Sil G/UV254, Macherey Nagel,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 99:1).

#### 6.2) Diméthoxytrityl-3-succinyl-1,3-propanediol

5 A 1,62g du produit obtenu ci-dessus dissous dans 20 ml de pyridine anhydre ont été ajoutés 1g (10 mmol) d'anhydride succinique et 1,22g (100 mmol) de diméthylamino pyridine. Le mélange est agité 16h à température ambiante, puis un excès d'eau a été ajouté pour stopper la réaction. Le mélange a été concentré et partitionné entre une phase acétate d'éthyl froid et une solution d'acide citrique froid à 10%. La phase organique a été lavée une fois de plus avec la solution d'acide citrique  
10 froid puis avec de l'eau salée. La phase organique est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  puis purifiée sur gel de silice sur un gradient de MeOH (0 à 5%) dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  contenant 0,25% de triéthylamine, conduisant à 1,3g du produit attendu.  $R_f = 0,48$  (Alugram Sil G/UV254, Macherey Nagel,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 95:5).

15 - 6.3) En opérant comme dans l'exemple 3 on a obtenu le décanucléotide AS4-3'-m3OH (SEQ ID n° 10).

#### Exemple 7 : Préparation de $\text{d}5'(\text{CACCGCCGGCGC})_p(\text{CH}_2)_3\text{OH}$

En opérant comme dans l'exemple 6 on a obtenu le dodécanucléotide (SEQ ID n° 15). La séquence SEQ ID n° 15 est complémentaire de l'ARNm ras normal.

#### Exemple 8 : Encapsulation des antisens

20 8.1. Les antisens adsorbés sur les nanoparticules peuvent être préparés de la manière suivante :

- On prépare une suspension nanoparticulaire par addition, sous agitation magnétique, de 100  $\mu\text{l}$  d'isobutylcyanoacrylate ou d'isohexylcyanoacrylate à un milieu de polymérisation composé d'acide chlorhydrique (1 mM, pH = 3 ou 10 mM,  
25 pH = 2) et de 1 g/100  $\text{cm}^3$  de dextran. La polymérisation des monomères cyanoacryliques s'effectue spontanément à une température voisine de 20°C. La polymérisation est totale après 2 heures en utilisant l'isobutylcyanoacrylate et après 6 heures en utilisant l'isohexylcyanoacrylate. Après neutralisation, 0,4 g/100  $\text{cm}^3$  de poloxamer 188 est ajouté pour stabiliser les nanoparticules.

30 - Les nanoparticules ainsi obtenues à une concentration de 0,5 mg/ $\text{cm}^3$  sont incubées avec 128  $\mu\text{M}$  d'antisens modifié selon l'invention, 500  $\mu\text{M}$  de cation

hydrophobe (par exemple le CTAB), dans un tampon Tris-HCl (10 mM, pH = 7) sans chlorure de sodium. Après 12 heures d'incubation, les nanoparticules peuvent être séparées de la suspension ou bien la suspension peut être utilisée, après dilution, pour tester l'efficacité de l'antisens adsorbé sur les cellules appropriées.

- 5 Généralement, on ajoute quelques  $\mu$ l de la suspension diluée (environ 100 fois dans l'eau distillée) à 100  $\mu$ l du milieu de culture contenant les cellules, le nombre de  $\mu$ l ajoutés étant calculé pour obtenir la concentration souhaitée en antisens.

8.2. Les antisens adsorbés sur les nanoparticules peuvent aussi être préparés de la manière suivante :

- 10 On met en suspension 10 mg/cm<sup>3</sup> d'un copolymère d'acide lactique-acide glycolique contenant 75 % d'unités lactiques D et L et 25 % d'unités glycoliques dans un milieu contenant 10 mM de TRIS-HCl à pH = 7 et 0,5 % de lécithine. Les nanoparticules sont incubées avec 2  $\mu$ M d'antisens, 1,6 mM de bromure de cétyltriméthylammonium. Après 12 heures d'incubation, les nanoparticules peuvent  
15 être séparées de la suspension.

Le taux d'adsorption de l'antisens aux nanoparticules est de 82 %.

#### Exemple 9 : Inhibition de la croissance des cellules HBL100ras1

- Cet exemple démontre les propriétés d'inhibition tout à fait remarquables des  
20 antisens selon l'invention.

- Les cellules HBL100ras1 ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits à une concentration de  $4 \cdot 10^3$  cellules par puits dans 50  $\mu$ l de milieu supplémenté de 7% de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur, d'antibiotiques et de glutamine. Lorsque les cellules adhèrent au puits de culture (généralement au bout de 2 à 3 jours), les  
25 antisens sont ajoutés, dans chaque puits, à deux fois la concentration finale dans 50  $\mu$ l de milieu de culture, résultant dans un volume final de 100  $\mu$ l par puits. Après 72 heures d'incubation à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules ont été comptées au moyen d'un hémocytomètre. La viabilité cellulaire, examinée au même moment par coloration au bleu trypan, est supérieure à 95% pour  
30 les cellules traitées et non traitées.

- Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2 suivant. Ils sont exprimés sous forme de pourcentage de prolifération des cellules par rapport aux cellules non traitées, selon la formule suivante :  $100 \times (Nn - N0) / (Nn - N)$ , dans laquelle N0 est le nombre de cellules présentes au départ, Nn est le nombre de cellules non traitées après n jours de croissance, et N est le nombre de cellules traitées après n jours.

TABLEAU 2

Produit	Cellules HBL 100-ras1		Cellules HBL 100	
	Concentration $\mu\text{M}$	% prolifération	Concentration $\mu\text{M}$	% prolifération
AS4 (SEQ 10)	10	26	10	89
AS-GLY (SEQ 15)	20	86	20	95
AS2 (SEQ 1)	10	94	10	100
AS2 adsorbé	0,1	45	0,1	75
	0,2	22	0,2	75
AS2-3'-m <sub>12</sub> OH (Exemple 3)	2	92		
AS2-3'-m <sub>12</sub> OH adsorbé	0,05	32		
AS4-3'-m <sub>3</sub> OH (Exemple 6)	0.025	2	0.025	100
	0.05	16	0.05	100
	0.005	40	0.005	100
AS-GLY-3'-m <sub>3</sub> OH (Exemple 7)	0.05	100		
	0.005	100	0.005	80
	0.5	97	0.5	61
m <sub>3</sub> : -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -				
m <sub>12</sub> : -(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -				

Les résultats obtenus montrent que :

- l'antisens (AS4-3'm<sub>3</sub>OH) modifié selon l'invention induit une inhibition de la prolifération des cellules HBL100ras1 à des concentrations très basses. Ces concentrations sont environ 100 fois plus faibles que celles auxquelles l'antisens non modifié est actif.
- les antisens de l'invention sont spécifiques des cellules contenant ras muté puisque aucun effet n'est observé sur les cellules HBL100néo. De même, l'antisens dirigé contre le gène normal (AS-Gly) n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules HBL100ras1.

Ces résultats montrent donc que les compositions de l'invention présentent une sélectivité et une activité très importantes. L'effet maximum pour une seule injection d'antisens a été observé trois jours après ajout de l'antisens à la culture.

Des résultats complémentaires ont été obtenus avec une autre série d'antisens (voir tableau 3). Les résultats représentent l'inhibition de la prolifération des cellules HBL100ras1 cultivées en présence de l'antisens indiqué pendant 24h. Les concentrations requises pour inhiber 50% de la prolifération cellulaire sont données dans le tableau 3.

Ces résultats confirment la sélectivité et l'activité très importantes des antisens de l'invention. Des effets particulièrement prononcés sont obtenus avec le 2,2-diméthyl-1,3 propanediol et avec l'acridine-dodécanediol (Acr5'-AS4-3'm<sub>12</sub>OH).

#### Exemple 12 : Etude d'affinité

Cet exemple montre que les antisens selon l'invention possèdent des affinités particulièrement élevées pour la séquence cible ras substrat. Pour cela, les antisens de l'invention AS4 (SEQ ID n° 10) modifiés à leur extrémité 3' par différents groupements ont été utilisés, dont l'antisens Acr5'-AS4-3'm<sub>12</sub>OH. Ces antisens ont été mis en présence d'une séquence cible ribonucléique, radiomarquée, d'une longueur de 27 nucléotides. Les analyses en retard sur gel permettent de déterminer les concentrations requises pour fixer 50% du substrat. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 3

Name	X	Formula	50% (µM) HBL100ras cells Growth inhibition
R5	-----	-----	15
1,3 Propanediol		$-O-(CH_2)_3-OH$	0,042
1,2 Propanediol		$\begin{array}{c} OH \\   \\ -O-(CH_2)-CH-CH_3 \end{array}$	2,5
2,2-Dimethyl-1,3-Propanediol		$\begin{array}{c} CH_3 \\   \\ -O-CH_2-C-CH_2-OH \\   \\ CH_3 \end{array}$	0,06
Amino-Propanediol		$\begin{array}{c} H \\   \\ -O-CH_2-C-CH_2-NH_2 \\   \\ OH \end{array}$	0,150
Hexanediol		$-O-(CH_2)_6-OH$	0,5
Decanediol		$-O-(CH_2)_{10}-OH$	0,25
Dodecanediol		$-O-(CH_2)_{12}-OH$	0,06
Acridine-Dodecanediol		Acridine, $-(CH_2)_{12}-OH$	0,04
Diethyleneglycol		$-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-OH$	0,06
Glycerol		$-O-CH_2-CHOH-CH_2OH$	0,04

Tableau 4

Name	X	Formula	50% (µM) Binding
R5	-----	-----	0,19
1, 3 Propanediol		-O- (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -OH	0,15
1,2 Propanediol		$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ -\text{O}-(\text{CH}_2)-\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$	0,2
2,2-Dimethyl-1,3-Propanediol		$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	0,19
Amino-Propanediol		$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ -\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \\   \\ \text{OH} \end{array}$	0,75
Hexanediol		-O- (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -OH	0,3
Decanediol		-O- (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -OH	0,6
Dodecanediol		-O- (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -OH	2,0
Acridine-Dodecanediol		Acridine, - (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -OH	0,7



### REVENDICATIONS

1 - Acide nucléique antisens simple-brin complémentaire d'une région d'un ARNm d'un oncogène ras humain portant une mutation ponctuelle, caractérisé en ce qu'il comprend 8 à 20 nucléotides et un groupement de formule  $-(CHR)_n-OH$  en 3' et/ou en 5', dans laquelle n représente un nombre entier compris entre 1 et 20 inclus, et R représente un atome d'hydrogène ou un groupe OH, R pouvant varier d'un groupement (CHR) à un autre.

2. Acide nucléique selon la revendication 1 caractérisé en ce que n représente un nombre entier compris entre 3 et 12 inclus.

10 3. Acide nucléique selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que le groupement de formule  $-(CHR)_n-OH$  est choisi parmi le dodécanediol, le propanediol, le diméthyl propanediol et le glycérol.

4 - Acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il comprend de 10 à 13 nucléotides.

15 5 - Acide nucléique selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il comprend 12 nucléotides.

6. Acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la mutation ponctuelle est localisée au centre de la région complémentaire.

20 7. Acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi AS2-3'm12OH; 5'm12OH-AS2; AS2-3'm3OH; 5'm3OH-AS2; 5'm12OH-AS2-3'm12OH, AS4-3'm12OH; 5'm12OH-AS4; AS4-3'm3OH; 5'm3OH-AS4 et 5'm12OH-AS4-3'm12OH, AS2-3'Glycérol ; AS4-3' Glycérol.

8. Acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce qu'il comporte une modification chimique supplémentaire.

25 9. Acide nucléique selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il comporte un ou plusieurs agents intercalants, tel l'acridine.

10. Acide nucléique selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il s'agit l'antisens de l'antisens Acr5'-AS4-3'm12OH

30 11. Acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisé en ce qu'il est encapsulé, inclus ou adsorbé dans une nanoparticule.

12 - Acide nucléique selon la revendication 11 caractérisée en ce qu'il est préalablement associé à des composés hydrophobes cationiques.

13 - Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 12 en association avec  
5 un ou plusieurs diluants ou adjuvants pharmaceutiquement acceptables.

14. Composition pharmaceutique selon la revendication 13 destinée à une administration intratumorale.



Figure 1A

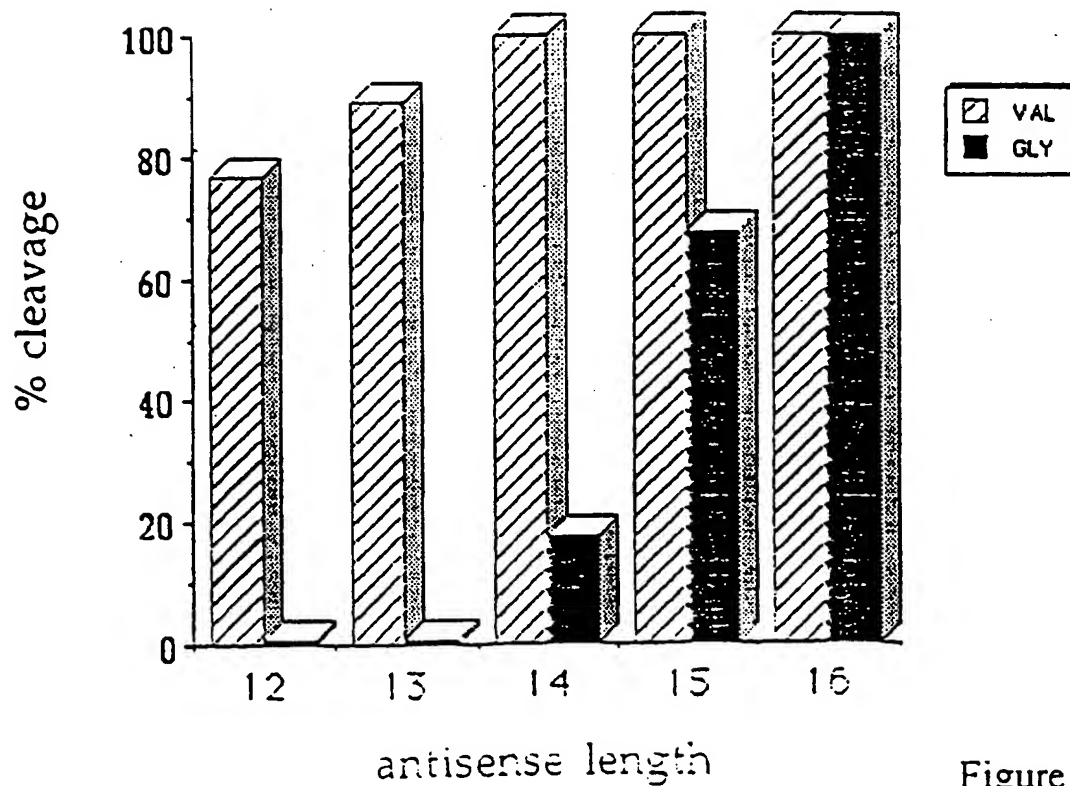


Figure 1B

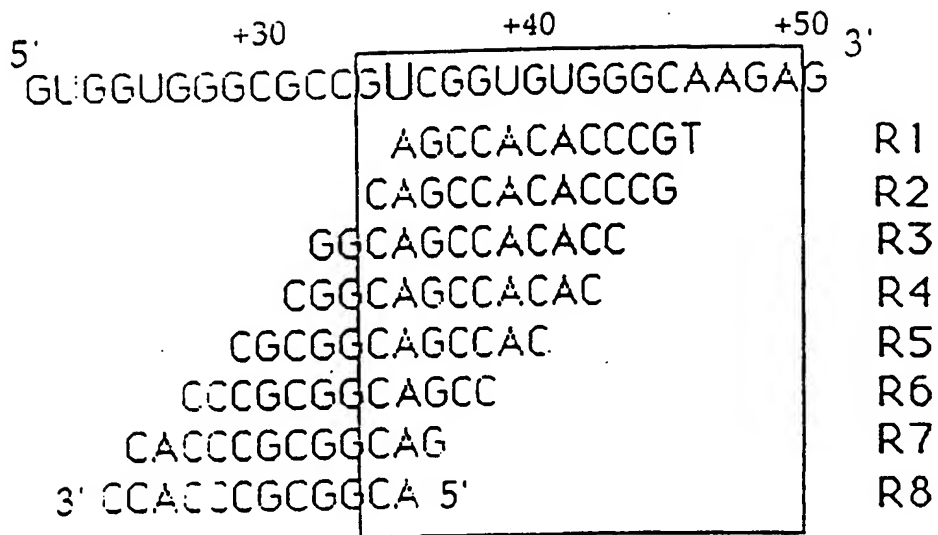


Figure 1C

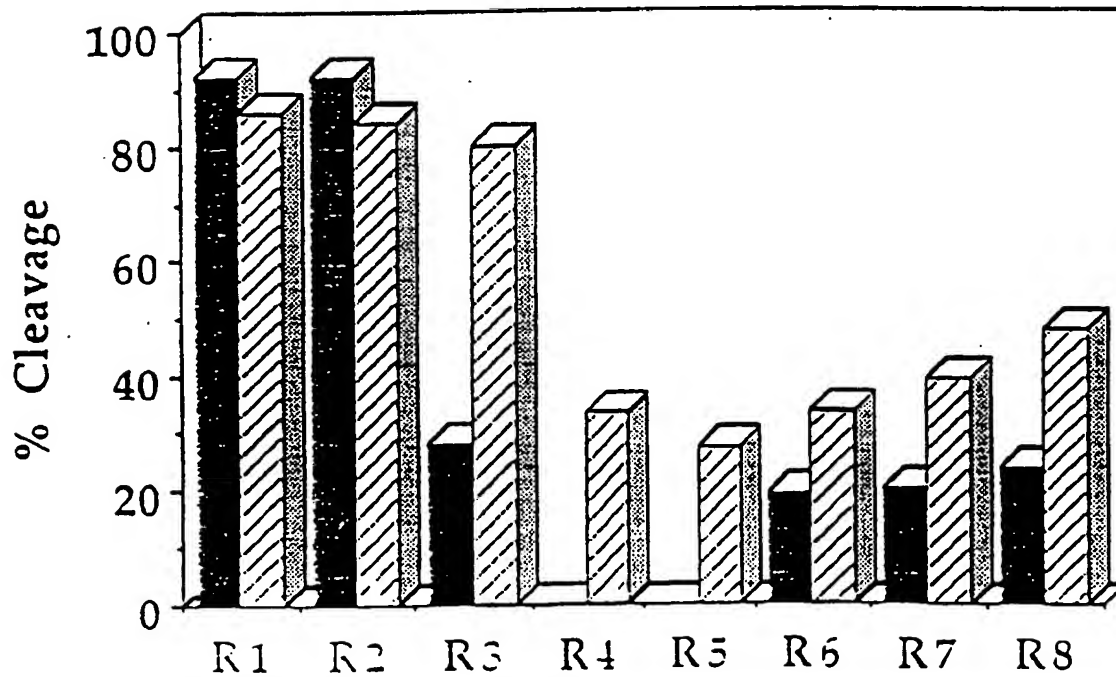


Figure 1D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/00652

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07H21/00 C12N15/11 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07H C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,92 02534 (STERLING DRUG, INC.) 20 February 1992 see the whole document ---	1
A	WO,A,94 08003 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 14 April 1994 see the whole document ---	1
A	WO,A,94 23755 (BOARD OF REAGENTS OF THE UNIVERSITY OF NEBRASKA) 27 October 1994 see the whole document ---	1
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \* "E" earlier document but published on or after the international filing date
- \* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \* "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 August 1996

Date of mailing of the international search report

30.08.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Scott, J

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THE EMBO JOURNAL, Vol. 10, No. 5, 1991, pages 1111-1118, XP002010153 T.SAISON-BEHMOARAS ET AL.: "Short Modified Antisense Oligonucleotides Directed Against Ha-ras Point Mutation Induce Selective Cleavage of the mRNA and Inhibit T24 Cells Proliferation." see the whole document ---	1
P,A	EP,A,0 653 438 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 17 May 1995 see the whole document ---	1
A	PHARMACEUTICAL RESEARCH, Vol. 9, No. 4, 1992, pages 441-449, XP002010154 C.CHAVANY ET AL.: "Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles as Polymeric Carriers for Antisense Oligonucleotides." see the whole document ---	1
A	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, Vol. 51, No. 2, 1993, pages 198-205, XP002010155 M.IMSCHENETZKY ET AL.: "Temporally Different Poly(Adenosine Diphosphate-Ribosylation) Signals Are Required for DNA Replication and Cell Division in Early Embryos of Sea Urchins." see the whole document -----	1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/00652

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9202534	20-02-92	US-A- 5245022	14-09-93
		AT-T- 131827	15-01-96
		AU-B- 2008195	12-10-95
		AU-B- 667459	28-03-96
		AU-B- 8521791	02-03-92
		CA-A- 2088673	04-02-92
		DE-D- 69115702	01-02-96
		DE-T- 69115702	13-06-96
		EP-A- 0541722	19-05-93
		ES-T- 2083593	16-04-96
		HU-A- 67834	29-05-95
		IL-A- 99066	31-01-96
		JP-T- 6502300	17-03-94
WO-A-9408003	14-04-94	AU-B- 5295993	26-04-94
		EP-A- 0670897	13-09-95
		FI-A- 951601	29-05-95
		JP-T- 7508657	28-09-95
		NO-A- 951306	04-04-95
		AU-B- 2249792	12-01-93
		BR-A- 9206156	17-10-95
		CA-A- 2111472	23-12-92
		EP-A- 0590082	06-04-94
		JP-T- 6504679	02-06-94
		WO-A- 9222651	23-12-92
WO-A-9423755	27-10-94	AU-B- 6633694	08-11-94
EP-A-653438	17-05-95	CA-A- 2129565	07-02-95
		JP-A- 7112997	02-05-95

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C07H21/00 C12N15/11 A61K31/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C07H C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,92 02534 (STERLING DRUG, INC.) 20 Février 1992 voir le document en entier ---	1
A	WO,A,94 08003 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 14 Avril 1994 voir le document en entier ---	1
A	WO,A,94 23755 (BOARD OF REAGENTS OF THE UNIVERSITY OF NEBRASKA) 27 Octobre 1994 voir le document en entier ---	1
-/--		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- \* "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \* "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \* "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \* "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \* "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \* "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \* "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \* "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \* "A" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 Août 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30.08.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Scott, J



C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>THE EMBO JOURNAL, vol. 10, no. 5, 1991, pages 1111-1118, XP002010153 T.SAISON-BEHMOARAS ET AL.: "Short Modified Antisense Oligonucleotides Directed Against Ha-ras Point Mutation Induce Selective Cleavage of the mRNA and Inhibit T24 Cells Proliferation." voir le document en entier ---</p>	1
P,A	<p>EP,A,0 653 438 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 17 Mai 1995 voir le document en entier ---</p>	1
A	<p>PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 9, no. 4, 1992, pages 441-449, XP002010154 C.CHAVANY ET AL.: "Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles as Polymeric Carriers for Antisense Oligonucleotides." voir le document en entier ---</p>	1
A	<p>JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. 51, no. 2, 1993, pages 198-205, XP002010155 M.IMSCHENETZKY ET AL.: "Temporally Different Poly(Adenosine Diphosphate-Ribosylation) Signals Are Required for DNA Replication and Cell Division in Early Embryos of Sea Urchins." voir le document en entier -----</p>	1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs membres de familles de brevets

Document Internationale No

PCT/FR 96/00652

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9202534	20-02-92	US-A-	5245022	14-09-93
		AT-T-	131827	15-01-96
		AU-B-	2008195	12-10-95
		AU-B-	667459	28-03-96
		AU-B-	8521791	02-03-92
		CA-A-	2088673	04-02-92
		DE-D-	69115702	01-02-96
		DE-T-	69115702	13-06-96
		EP-A-	0541722	19-05-93
		ES-T-	2083593	16-04-96
		HU-A-	67834	29-05-95
		IL-A-	99066	31-01-96
		JP-T-	6502300	17-03-94
		-----		
WO-A-9408003	14-04-94	AU-B-	5295993	26-04-94
		EP-A-	0670897	13-09-95
		FI-A-	951601	29-05-95
		JP-T-	7508657	28-09-95
		NO-A-	951306	04-04-95
		AU-B-	2249792	12-01-93
		BR-A-	9206156	17-10-95
		CA-A-	2111472	23-12-92
		EP-A-	0590082	06-04-94
		JP-T-	6504679	02-06-94
		WO-A-	9222651	23-12-92
		-----		
WO-A-9423755	27-10-94	AU-B-	6633694	08-11-94
-----				
EP-A-653438	17-05-95	CA-A-	2129565	07-02-95
		JP-A-	7112997	02-05-95
-----				